

CANCER TREATMENT AGENT CONTAINING INHIBITOR OF SPHINGOGLYCOLIPID METABOLISM AS EFFECTIVE COMPONENT**Publication number:** JP1254623**Publication date:** 1989-10-11**Inventor:** NOOMAN ESU RADEIN; INOKUCHI JINICHI**Applicant:** UNIV MICHIGAN**Classification:**

- International: A61K45/00; A61K31/165; A61K31/535; A61K31/5375; A61P3/00; A61P35/00; C07D295/12; A61K45/00; A61K31/165; A61K31/535; A61K31/5375; A61P3/00; A61P35/00; C07D295/00; (IPC1-7): A61K31/165; A61K45/00; C07C103/38

- European: A61K31/535

Application number: JP19880152065 19880620**Priority number(s):** US19880176920 19880404**Also published as:**

US5041441 (A1)

Report a data error here**Abstract of JP1254623**

PURPOSE: To prepare a therapeutic agent for cancers comprising an inhibitor of the sphingoglycolipid metabolism as an active ingredient without suppressing functions of the bone marrow and systems related thereto. **CONSTITUTION:** This therapeutic agent for cancers comprises an inhibitor of the sphingoglycolipid metabolism, preferably a compound represented by the formula (R is an aromatic ring, cyclohexane or a 10-15C aliphatic group; R<1> is an amine; R<2> is a 9-17C aliphatic group) and its therapeutically permissible salt, e.g. D-, L and DL-threo-1phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol as an active ingredient. The therapeutic agent can further be used for treating non-malignant diseases caused by cell proliferation such as benign tumors, warts and skin growth, preventing the fetal growth and terminating undesirable pregnancy.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑫ 公開特許公報(A) 平1-254623

⑤ Int. Cl.⁴ 識別記号 庁内整理番号 ④ 公開 平成1年(1989)10月11日
 A 61 K 31/165 ADU 7330-4C
 45/00 ADD 8829-4C
 // C 07 C 103/38 審査請求 未請求 請求項の数 10 (全10頁)

⑭ 発明の名称 スフィンゴ糖脂質代謝の阻害剤を有効成分として含有する癌治療薬

⑯ 特 願 昭63-152065

⑰ 出 願 昭63(1988)6月20日

特許法第30条第1項適用 1987年12月22日 エルセビア-サイエンティフィックパブリッシャーズ
 アイルランドリミテッド発行の「キャンサーレターズの第38巻第1章の第23-30頁」に発表

優先権主張 ⑱ 1988年4月4日 ⑲ 米国(US) ⑳ 176920

㉑ 発 明 者 ノーマン エス. ラデ アメリカ合衆国ミシガン州アン アーバー, ターフム ロ
 イン ド 3544

㉒ 発 明 者 井 ノ ロ 仁 一 福岡県福岡市西区今宿町小松原539-31

㉓ 出 願 人 ザ リーゼンツ オ アメリカ合衆国 ミシガン州, アン アーバー, ウェスト
 ブ ザ ユニバーシテ エンジニアリング ビルディング 225
 イー オブ ミシガン

㉔ 代 理 人 弁理士 浅 村 皓 外3名

明 細 書

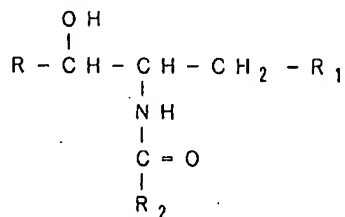
1. 発明の名称

スフィンゴ糖脂質代謝の阻害剤を有効成分として含有する癌治療薬

2. 特許請求の範囲

1. スフィンゴ糖脂質代謝の阻害剤を有効成分として含有する癌治療薬。

2. 阻害剤が一般式



(式中、Rは芳香族環、シクロヘキサンまたは炭素原子数10～15を有する脂肪族基であり、
 R₁はアミン基であり、R₂は炭素原子数9～17を有する脂肪族基である)の化合物およびその治療的に許容し得る塩である請求項1記載の癌治療薬。

3. 阻害剤が1-フェニル-2-アシルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノールである請求項2記載の癌治療薬。

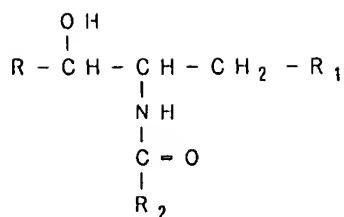
4. 阻害剤がD-、L-およびDL-スレオール-1-フェニル-2-デカノイルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノールからなる群から選択される請求項3記載の癌治療薬。

5. 非毒性の酸を含有する請求項1記載の癌治療薬。

6. 非イオン性の界面活性剤を含有する請求項1記載の癌治療薬。

7. スフィンゴ糖脂質が、グルコシルセラミドまたはその誘導体である請求項1記載の癌治療薬。

8. スフィンゴ糖脂質がグルコシルセラミドまたはその誘導体でありそして阻害剤が一般式



(式中、Rは芳香族環、シクロヘキサンまたは炭素原子数10～15を有する脂肪族基であり、R₁はアミン基であり、R₂は炭素原子数9～17を有する脂肪族基である)の化合物またはその治療的に許容し得る塩である請求項1記載の治療薬。

9. Rがベンゼン環である請求項8記載の治療薬。

10. 阻害剤が1-フェニル-2-アシルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノールである請求項8記載の治療薬。

3. 発明の詳細な説明

発明の背景

本発明は、一般に病治療法、更に詳しくは、ス

されている。本発明は、スフィンゴ糖脂質と称される前者の型のセラミド誘導体に関する。

スフィンゴ糖脂質においてグリコシド結合で直接結合している糖分子はD-ガラクトース又はD-グルコースであり、セラブロシドと称される。最近、セラブロシドはその糖部分によつてより具体的にはグルコシルセラミドまたはガラクトシルセラミドと称されている。前者はすべての型の細胞に存在するけれども、後者は主に神経系に見出される。本発明は、特にグルコシルセラミドおよびその誘導体(以下まとめて“グルコリビド”と呼ぶ)を取扱うものである。

グルコシルセラミドは、ある程度、D-ガラクトースが、グルコースにグリコシド結合で結合した誘導体として存在する。該誘導体は、ラクトシルセラミドまたはラクトシドと称される。他のグルコリビドは、シアル酸、ガラクトース、アセチルグルコサミン、アセチルガラクトサミンおよびフコースのような他の糖の連続付加によつてラクトシルセラミドから形成される。生成物は、グロ

フィンゴ糖脂質代謝を妨害することによつて病を治療する化学療法的方法に関するものである。

スフィンゴ脂質は、主要な部分が、長鎖塩基、最も一般的にはスフィンゴシンである天然に存在する脂質である。長鎖塩基は、C-2位に第1級アミン基そして隣接炭素原子上に2個の水酸基を有する脂肪アルキル鎖からなる。遊離のスフィンゴシンは非常に低濃度で存在するけれども、大部分のスフィンゴシン分子は長鎖脂肪酸が塩基のアミノ基に結合したアミドとして存在する。このアミドは、すべての複合体スフィンゴ脂質の代謝の前駆体として作用するセラミドと称されるものであり、容易に検出できる濃度で組織中に存在する。

セラミドは、長鎖塩基の末端(C-1位)に第1級アルコール基を、C-3位に第2級アルコール基を有している。第2級アルコール基はすべての公知のスフィンゴ脂質において遊離の水酸基であるけれども、哺乳動物のセラミド誘導体における第1級水酸基は糖分子とのβ-グルコシド結合体または燐酸分子とのエステル結合体として見出

ボシド、ハマトシド、血液型物質、フコリビドおよびガングリオシドのような非系統的名称で文献にみられる。

糖の種々な結合特性およびこれらを相互に結合することに対して応答しうる種々な酵素のために、多くの異なるグルコリビドが、哺乳動物の組織に存在する。これらの脂質の大部分は静電気学的に中性である。しかしながら、ガングリオシドと称されるシアル酸を含有するものは、存在するシアル酸部分の数によつて1以上の負の電荷を有することができる。この型のグルコリビドは、神経系の灰白質中に比較的高濃度で存在するが、すべての型の細胞は数種類の型のガングリオシドを少量含有している。

グルコリビドは、長年知られているけれども、その低濃度、容易に定量される基の不足、および種々な構造のため、特徴化し、かつ研究することが困難であつた。それ故に、最近まで、その存在および機能の研究はあまり行なわれていなかった。しかしながら、最近では、生命過程においてグル

コリビドによつて行なわれる生命の維持に必要な役割についての認識が増大している。動物細胞における重要な膜成分であることに加えて、グルコリビドは組織免疫および細胞対細胞認識に緊密に深くかかわっているように思われる。グルコリビドは、例えば、動物の種々な器官からの細胞に対する識別マーカーとして働くことによつて細胞対細胞認識および伝達を媒介する。更に、細胞表面上のグルコリビドの表現は細胞が分裂および分化するにつれて変化するので、グルコリビドはまた生体の系統的成長および発育に対して必須のものでもある。

スフィンゴ脂質代謝の重要性は、その代謝系路が遺伝的に障害を受けている結果から生ずる疾病の重大さによつて強調される。例えば、スフィンゴ脂質分解経路における酵素が欠損し、患者の体内に多量の本脂質が蓄積した結果生ずるテイーサックス病、ゴーシエ病およびファブリー病では、すべての患者が重篤な臨床症状を呈している。更に、より重要なことには、スフィンゴ脂質、

特にグルコリビドが癌の過程に関連があるものとする具体的な証明が増加して来ていることである。

例えば、グルコリビドはフィブロネクチンのような接着蛋白質と細胞の結合に関係しており、それ故に癌細胞の浸潤および転移性と深い関係があるかもしれない。グルコリビドは、また、癌細胞の急激な成長に重要である成長促進因子などと複合体を形成する細胞表面受容体部位の必須な生体成分として存在することが判っている。更に、細胞がウイルスに感染するか又は急速に増殖するように誘起される場合は、培養した細胞のグルコリビド組成は変化する。特に、ガングリオシドは、試験管内及び生体内で細胞の著しい増殖または成長を促進する。

癌細胞は、また、グルコリビドの高度な代謝活性を有すると思われる。ヒト白血病細胞は、通常のレベルの3倍のグリコシダーゼ即ちグルコシルセラミド分解酵素を有していることが判っている。研究により、ラット肝癌組織において、スフィンゴ脂質のガラクトシルトランスフェラー

ゼの活性が通常の特異的活性度の10倍にも上昇していることが示されている。ヒト腫瘍は、また、正常な細胞に対して異質であるグルコリビド形成酵素、即ちアセチルグルコサミントランスフェラーゼを含有することが判った。

マウスに対しグルコシルセラミドの注射を行なうと、肝臓の成長(優先的に脂質を吸収する)の著しい急速な刺激を起すことが判っている。エールリツヒ腹水癌細胞を有するマウスの場合においては、グルコシルセラミドの注射を行なうと、50%を超える癌細胞の数の増加をひき起す。最近の研究により、グルコシルセラミドの蓄積から生ずるゴーシエ病にかかった患者は、意外にも白血病および他の日一細胞増殖病の高度な出現率を有することも示されている。

腫瘍が、僅かに悪性であることから強度の悪性に進行すると、腫瘍はグルコリビドの調和が著しく変化したことを示す。腫瘍に由来するこれらのグルコリビドはリンパ球の増殖する能力を妨害することが見出されている。これにより、癌患者の

免疫学的保護機構の有効性の欠損が説明されている。しかしながら、特異的グルコリビド(マウスにおいて生成された)に対する抗体の注射は、黒色腫にかかった患者に非常に有効であることが証明されている。

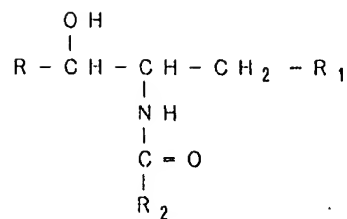
注目すべきことには、癌組織には、もとの正常組織においては生成されていないか、存在しても極く微量のグルコリビドが多々見い出されている。また、加速度的なペースで、科学者等は癌組織中の若干のグルコリビドは何れの正常な組織中においても以前に知られていなかったということを知見している。換言すると、多くの又はすべての腫瘍が、通常ヒトに対して異質である新規なグルコリビドを生成又は蓄積する能力を有していると思われる。また、これらの物質のすべてがグルコシルセラミドから酵素的に形成されたグルコリビドであるということに留意することは重要なことである。

注目すべき具体的な証明により、スフィンゴ脂質、特にグルコシルセラミドおよびその誘導

体即ちグルコリビドが、少なくともある型の癌性細胞の増殖および転移性を支配する重要な役割を果たすということが示されている。これは、癌細胞がスフィンゴ脂質代謝の妨害に対して特別に感受性があるということを示す。従つて、本発明の目的は、スフィンゴ脂質代謝を妨害することによつて癌を化学療法的に治療する方法を提供することである。本発明の他の目的は、例えば良性腫瘍のような未抑制細胞増殖によつて起こる非悪性疾患の化学療法的治療方法を提供することである。

発明の概要

本発明は、細胞をスフィンゴ脂質代謝に対する実質的な阻害作用を有するものに有効な量の阻害剤と接触させることによつて癌細胞を処置する方法を提供する。好適には、阻害剤は、下記一般式：



(式中、Rは芳香族環、シクロヘキサン又は炭素原子数10～15を有する脂肪族基であり、R₁はアミン基であり、R₂は炭素原子数9～17を有する脂肪族基である)を有する化合物およびその治療的に許容し得る塩である。

上記式において更に好適には、Rはフェニルであり、R₁はモルホリノ基であり、R₂はn-ノニル鎖である。また好適な阻害剤は1-フェニル-2-アシルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノールである。

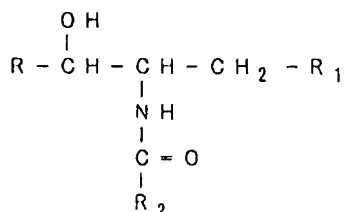
発明の好ましい態様

本発明によれば、癌細胞は、細胞をスフィンゴ脂質の代謝経路を妨害する阻害剤と接触させることによつて処置される。阻害剤は、スフィンゴ

脂質特に以下まとめて“グルコリビド”と呼ばれるグルコシルセラミドおよびその誘導体の酵系合成をブロックするかまたはその輸送のような他の生理学的過程をブロックすることによつて作用しうる。

更に、本発明の方法は、良性腫瘍、いぼ、皮膚成長などのような細胞増殖によつて起る非悪性疾患を治療するために使用することができる。本発明の方法は、また、胎児発育の防止および望ましくない妊娠を終らせるために使用することもできる。

本発明の方法の実施に適した阻害剤は下記一般式：



(式中、Rは芳香族環、シクロヘキサン又は炭素

原子数10～15を有する脂肪族基であり、R₁はアミン基であり、R₂は炭素原子数9～17を有する脂肪族基である)を有する化合物およびその治療的に許容し得る塩である。

本発明の阻害剤は、広範囲の様々な薬学的形態で使用することができ、薬剤は、そのまま使用するか、又は薬学的に許容し得る担体または他の賦形剤もしくは添加剤と混合することができる。一般に、薬剤は経口的または静脈内に投与される。投与の量、割合/頻度および手段の選択は当業者の技術範囲にあり、治療する医師または従事する獣医の正しい医術判断に任せることができる。本発明の方法は、単独でまたは他の治療法と併用して使用してもよい。

好適な阻害剤の合成は、当業者の技術範囲にある。例えばJ. Lipid Research 28巻、565～571頁(1987年)のイノクチおよびレーデインの“1-フェニル-2-デカノイルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノールの製造”を参照されたい。更に、本発明は、以下の試験データ

から理解されるであろう。

試験データ

試験 1

ハルラン・スプラグ・ダウレー（インディアナ州インディアナポリス）からのICR（スイスHsd）系の雄マウスに、エールリツヒ腹水腫瘍細胞（EATC） 2×10^6 個を含有する食塩水を0日目に腹腔内に注射する。それぞれのおりには、同様な平均値（約25g）および同様な標準偏差についてコンピュータープログラムによつて重量調節した4または5匹のマウスが入っている。24時間後に食塩水又は酢酸塩もしくは塩酸塩としての阻害剤の腹腔内注射によつて処置を開始する。阻害剤は40℃の食塩水に溶解し、体重1g当たり10μlで注射する。例えば塩酸塩のような溶解することが困難である薬剤の場合においては、非イオン性の低毒性の界面活性剤を含有させて薬剤を乳化させ、薬剤を注射に好適なものにする。2つのおりのマウスをそれぞれ対照群と試験群に割り当て標準試験室食餌を与える。殆どすべての

場合において、マウスは全体で毎日1回、10日間（10回）の投与量を注射する。

非対試料についての片側スチューデントのtテスト（1-tailed Student t-test）を、統計学的分析に対して使用した。第1表は試験結果を示す。

第1表

マウスにおけるD-スレオ-PDMP
(酢酸塩)の抗腫瘍活性

使用量 (mg/Kg/日)	10日目の生存数 (a)	体重変化 (b)	60日目の生存数 (c)	90日目の生存数 (d)
食塩水対照	10/10	+10.9g	0	0
1×100 1~10日	10/10	+1.62	7(4)	4* (4)
2×100 1~5日	10/10	+3.78	5(3)	3* (3)
1×150 1~10日	10/10	-0.36	7(3)	5 (3)
2×150 1~5日				
1×150 6~10日	8/9	-3.49	5(3)	5(3)

・固形腫瘍を有するマウスは苦痛を減少させるために90日前に屠殺した。

④欄には、低薬剤毒性が示されている。④欄では10日終了後の平均体重の変化を示す。本物質投与群では、体重増加の抑制があり、軽度な薬剤毒性が認められる。正常な未接種マウスは、この期間中に約4.5g体重が増加する。対照マウスにおける体重増加は、EATCの急激な増殖とそれにとまなう腹水のために非常に高い。④欄では、()内は治癒したマウスの数を示し、()外の数値には治癒したマウスおよび固形腫瘍を有するマウスが含まれている。

食塩水注射対照群は、常にEATCおよび腹水液の急速な形成を示し、著しく膨張した腹部を有す（生存中央値約24日）。D-スレオ-PDMPで処置したマウスの約30%は、種々の養生法によつて完全に治癒した。治癒したマウスは、いずれの時期においても腹水液形成の徴候がなく、10カ月後には体重増加は一時的に緩慢であるかまたは負であるけれども健康であるように思われる。残りのマウスは細胞の固形腫瘍のために死亡したが、未処置のマウスよりはかなり長く

生存した。薬剤に対する中央T/C比は、前述した4つの処置群について191%、238%、319%および150%であり、これらの値は“高度に有望な”抗腫瘍性剤に対して認められた最小値より十分に大きい。

D-スレオ-PDMPの投与量応答試験は、全体の治癒の%が示すように、使用量が増加するにつれてT/C指数が増大することを示す。薬剤により初期に死亡する場合は減少したけれども、25又は50mg/kgを注射した動物は対照と大体同じ時期に死亡した。60日間生存する割合は、それぞれ75、100および125mg/kgに対して10%、20%および50%であった。接種後5ヵ月以上経過後において、もつとも多量に投与した2つのマウス群の40%は、なお生存し、健康であった。

試験2

炭素原子数10~18の長さの脂肪酸から製造したPDMPの同族体を使用して前述した試験操作を再び行なった。化合物はD-およびL-光学

対準体に分割しないが、スレオ立体異性体を塩酸塩として使用した。試料はすべてMYRJ52

(15mg/kg)中で乳化した。C₁₀、12、14、16同族体の場合においては10日間の毎日注射を行なったが、パルミトイル同族体は余りに有毒であるので6回を超えて使用することができずとみなした。ステアロイル化合物の場合には、初期の体重喪失が大きいため、使用量を2~10日の間は初期のレベルの1/2に減少した。試験結果は、第2表に示す通りである。

第2表

MYRJ乳濁液で毎日注射した
DL-PDMP同族体の抗腫瘍性

脂肪酸 の長さ	10日後 の生存数	10日時点 における 体重増加	50日に おける治癒	50日に おける 固形腫瘍
食塩水 対照	7/8*	10.4g	0	2**
MYRJ 対照	8/8	12.6	0	0
10	8/8	0.4	5	1
12	6/8	-0.1	2	2
14	6/8	0.1	1	4
16	5/8	-1.1	3	1
18	7/8	2.5	6	0

薬剤は0.3ミリモル/kgで注射した(但し、C₁₆は0.15ミリモル/kg、C₁₈は1日目に0.15ミリモル/kg、残りの9日間0.075ミリモル/kg注射する場合を除く)。

* 対照マウス1匹は10日以内に腫瘍のため死亡。

** 対照マウス2匹は、固形腫瘍を形成するほど長期間例外的に生存した。

第2表は、長鎖同族体は与えられた使用量において有効であるがすべての同族体が若干の治療効果を有し、1~6匹の正常に見える、明らかに治癒したマウスが得られるということを示す。DL-スレオ-PDMPによる長期間治療割合は、128mg/kgの使用量においてD-スレオ-PDMPによる前記研究より良好な50%であった(第1表)。C₁₈同族体からのデータは、PDMPと比較して急性の初期毒性反応の不存在、良好な体重増加および低モル投与量での有効性を示す。血流によつて固形腫瘍に対して有効であるEATCに対して形成されたマウスの抗体のために、デカノイル群(PDMP、C₁₀)マウス2匹に生じた小さな固形腫瘍が、後に消失し、これらのマウスが治癒したことは注目しなければならない。この効果は、グルコリピド代謝の阻害剤が宿主の抗癌免疫防御系を強化するものとして期待されるものである。

試験3

前記の試験操作を再び行なつて第3表に記載し

た結果を得た。

第3表

L-スレオ-PDMPの抗腫瘍活性

使用量 (mg/Kg)	10日後の 体重変化	60日での マウスの 正常状態	60日での マウスの 固形腫瘍
食塩水	13.2g	0	0
対照			
75	3.2	4	2
100	1.9	4	3
125	0.8	2	3
150	-0.2	5	3

L-スレオ-PDMPはセラミドグリコシルトランスフェラーゼの阻害剤として有効でなく、したがって以下“GlcCer”と称するグルコシルセラミドの酵素形成をブロックすることができないけれども、60日の観察期間を含む第3表のデータは、腫瘍の治癒においてL-光学対掌体がD-光学対掌体よりも有効であることを示す。処置を行

なつたマウスにおいて固形腫瘍は実際に若干発育するけれども腹水液は一度もみられなかつた。マウスの急性毒性反応は、D-異性体による場合よりも明らかに小さく、処置の初期の10日の間動物の損失がないことから明らかである。固形腫瘍の消失は、使用量をより多くした2匹のマウスにおいて観察される。PDMPのL-スレオ異性体の有効性は、グルコリビド合成に係わる他の酵素の阻害作用に基づくか、又はグルコリビド輸送蛋白質の遮断作用による可能性が推測される。

試験4

10匹の正常な非癌性マウスにD-スレオ-PDMPを10日間毎日注射し、その後5時間後に屠殺し、第4表に記載した結果を得た。

第4表

100mg/Kg/日で10回注射したD-スレオ-PDMPによる毒性試験

	対 照	PDMP
体重(g)	29.8 (1.4)	26.5 (1.2) **
肝臓重量(g)	1.61 (0.11)	1.32 (0.12) **
肝臓重量(体の%)	5.57 (0.24)	4.97 (0.52) **
腎臓重量(g)	0.394 (0.045)	0.329 0.239 (0.027) **
腎臓重量(体の%)	1.37 (0.11)	1.24 (0.13) *
脳重量(g)	0.465 (0.025)	0.444 (0.015) *
脳重量(体の%)	1.61 (0.08)	1.67 (0.08)
脾臓重量(g)	0.099 (0.018)	0.095 (0.019)
脾臓重量(体の%)	0.34 (0.05)	0.36 (0.07)

()内の数値は標準偏差である。初期の平均体重は、24.4gである。

* Pは0.025未満である。

** Pは0.05未満である。

対照マウスは平均4.5g体重が増加した。一方処置したマウスは2.1gの体重増加を示し、対照群に比較して程度ではあるが体重増加の抑制が認められた。臓器別では、肝および腎が対照に比しそれぞれ18%および17%有意に小さかつた。脾臓は僅かにより小さいが、有意なほど小さくなく、脳は4.6%小さい(Pは0.025未満である)。全身毒性の重要性を最小化するために体重の%に関するデータを使用した場合、肝臓と腎臓のみが、有意に小さい(Pは0.05%未満である)。器官サイズの上記減少は、グルコシルセラミドの注射により、肝臓が成長するので、組織グルコシルセラミドの減少したレベルから予測されるものであつた。

試験5

消失性の少ない応答を観察するために、前述した試験を反復した。試験4と同様に12回毎日注射を行ない、最後の注射の40時間後にマウスを屠殺する。ここで、絶対重量のうち、腎臓のみが処置したマウスにおいて統計学的に異なり11%

小さい(Pは0.05%未満である)。40時間および5時間試験の比較において、肝臓の重量は腎臓よりも速やかに正常に戻り、これはおそらく、肝臓におけるより速やかなグルコリピド代謝回転速度の反映によるものであると思われる。

眼窩血液に対して行われた鑑別血球計算の結果、上記のD-スレオ-PDMP投与群のマウスの細胞数(赤血球、白血球、単核球、リンパ球、好酸球、好中球)は、いずれも正常であつた。このことは、D-スレオ-PDMPには、多くの抗腫瘍剤において高頻度に認められる骨髄およびその関連した系の機能の抑制が無く、本物質の抗腫瘍剤としての有用性を強く示唆するものである。

試験6

GlcCerの懸濁液を、前述したように1日前にEATCを接種した10匹のマウスの1群に注射する。GlcCerおよびガラクトシルセラミド(GalCer)の注射用懸濁液は、食塩水(10mg/ml)中で機械的に粉碎することによって調整し、100mg/kgの使用量で注射する。1つの試験に

おいては、8日間毎日注射を行ない最後の注射の1日後に屠殺し、EATCを緩衝化食塩水で腹部からフラッシュ除去し、洗浄する。食塩水注射対照は凝縮遠心分離細胞3.07ml(1匹のマウス当たりの平均値)であり、一方GlcCer注射したマウスは4.68ml、即ち52%の増加(Pは0.05未満である)であつた。血球計による細胞計算は同様な増加を示すので細胞は大きさよりも細胞数が増大したということを結論づけることができる。D-スレオ-PDMPおよびGlcCerで処置したマウスは、細胞1.57ml(GlcCer細胞に比較して66%の減少)であつた。この統計学的に有意な差は、GlcCerの存在下でさえもEATCの成長を阻害するというPDMPの能力を示す。

このように、GlcCer代謝は、EATC成長の速度・抑制因子であるということが証明される。上記試験において、外因性GlcCer摂取および利用の速度は、本脂質に対するEATCのすべての要求を供給するのに十分なほど急速ではないことを示

唆している。

試験7

EATC接種の3日後に処置を始めた。注射を5回のみ行ない、マウスを1日後に屠殺した。結果は、第5表に示す通りである。

第5表

セレブロシド及びグルコシルトランスフェラーゼ
阻害剤の存在下における生体内でのエールリツヒ
腹水細胞の成長

処置	凝縮細胞の容積	
	(ml/マウス) K	対照の%
食塩水比較対照	2.72 ± 0.95	100
GlcCer (100mg/kg)	4.13 ± 0.63	152**
GalCer (100mg/kg)	2.29 ± 1.21	84
GlcCer+D-スレオ-PDMP(100mg/kg)	1.40 ± 1.19	51*
D-スレオ-PDMP	1.68 ± 0.86	62*

* 対照に比較してPは0.05未満である。

** 対照に比較してPは0.01未満である。

第5表に示したように、GalCerはEATCの増殖促進効果がなかった。GlcCerおよびGalCerは、セラミド、スフィンゴシンおよび脂肪酸に異化されるが、GlcCerのみはガングリオシドを包含する高級グルコリピドに同化される。薄層クロマトグラフィーによつてEATCがGalCerおよびGlcCerの両脂質を吸収することが判明したが、GlcCerのみが細胞増殖促進作用することは重要な点である。GlcCerを注射した正常なマウスには、遊離腹膜細胞の有意な数の形成がなかった。

試験8

D-スレオ-PDMPが動いてGlcCer生合成を阻害することは下記に示すようにグルコシルトランスフェラーゼの試験から明らかである。酵素源としてのミクロソームを高速遠心分離によつて調製し、ミクロソーム、ATP、リボソームオクタンイルスフィンゴシン、UDP-[^3H]glu、 Mg^{2+} およびジチオエリスリトールを使用して37℃で30分間の酵素反応を行なう。EATCからのミクロソーム(蛋白質0.50mg)がグルコ

シルトランスフェラーゼ活性を1/2減少するのにPDMP20 μH が必要である。正常な肝臓からのミクロソーム(蛋白質72 μg)はD-スレオ-PDMP5 μH を必要とする。EATC酵素は阻害剤に対して感受性が小さいと思われるけれども、阻害剤の腹腔内濃度は、初期に非常に高い。PDMPのL-光学対掌体は、正常なマウス組織のグリコシルトランスフェラーゼに対して観察されるように、EATCの本酵素を阻害しなかった。

EATCのミクロソーム分画におけるグルコシルトランスフェラーゼの特異活性(0.41ミリモル/h/蛋白質mg)は、正常なICRスィスマウスからの肝臓ミクロソームの1/7にすぎないことが見出されたことは予期しないことであつた。本発明者等の試験的な結論は、これらの細胞が腹膜から多量のGlcCerを得るということである。このように、薬剤の有効性は、試験的に宿主および腫瘍細胞の両方GlcCer合成の遮断に基づくものとすることができる。

試験9

試験1で示したように、EATC接種マウスはD-スレオ-PDMPの投与により約30%が治癒した。これらの4匹のマウスに 2×10^6 個のEATCを最初の接種から63日後に再度接種した。その結果、マウスは、7カ月を超える観察期間にわたり再接種の影響を受けず正常であつた。5匹の他の生存マウスをEATC接種後135および100日目に同様にEATCを再度接種した結果、4匹が5カ月を超える観察期間において癌化しなかった。一方、上記のマウスと同年令の無処理の正常マウスは、EATCの接種後、若いマウスと同様に全てが癌化した。本発明者等は、マウスがEATC+PDMPによつて有効に「生細胞によるワクチン化」を受けたと結論した。

試験10

ここでは、毒性の低い界面活性剤をD-スレオ-PDMPと併用することによる抗腫瘍効果を検討した。

マウスの4つの群(1群当たり8匹)に、D-

スレオ-PDMP(120mg/kg)およびMYRJ52またはPLURONIC F68(60又は180mg/kg)をEATC接種後1日目から10日間1日に1回注射する。いずれの投与でも急性毒性は認められず、10日後においては全てのマウスが生存していた。60日後において明らかに治癒したマウスの数は2つのMYRJ群については2および3匹そして2つのPLURONIC群については1および3匹であり、いずれの界面活性剤を用いた場合にも、高用量の際に明らかにPDMPの有効性が強化された。

多くのグルコリピドが、細胞の外部(血漿)膜中存在しており、D-スレオ-PDMPによるそれらの減少が腫瘍血漿膜を物理的に不安定にし、界面活性剤による膜の破壊が促進されたものと思われる。本化合物の変形、変化および置換の範囲の変化は前述した説明において意図されるものであり、ある場合においては本発明のいくつかの特徴は他の特徴と対応して使用することなく用いられるであろうということは理解されねばならない。

したがって、特許請求の範囲は広く、かつ本発明
の精神および範囲と一致するような方法で解釈し
なければならない。

代理人 浅 村 皓